

10/536797
PCT/JP03/15201

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

26.3.2004

REC'D 21 MAY 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年11月28日

出願番号
Application Number: 特願2002-346325
[ST. 10/C]: [JP 2002-346325]

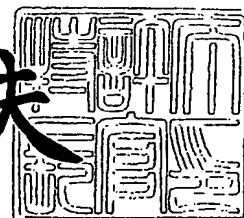
出願人
Applicant(s): 独立行政法人 科学技術振興機構

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月30日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3037.167

【書類名】 特許願
【整理番号】 P033P01
【提出日】 平成14年11月28日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 38/00
A61P 9/10
A61P 25/28

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県岡崎市竜美旭町 1 2 - 1 3

【氏名】 岡田 泰伸

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県奈良市東登美ヶ丘 2 - 1 - 1 2

【氏名】 森島 繁

【発明者】

【住所又は居所】 宮崎県宮崎郡清武町船引 9 8 7 - 1

【氏名】 鍋倉 隆

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100080034

【弁理士】

【氏名又は名称】 原 謙三

【電話番号】 06-6351-4384

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003229

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0111475

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞死の抑制方法、細胞死抑制剤、及びその細胞死抑制剤を含む細胞死に起因する疾患の治療薬剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アニオンチャネル形成ペプチドを乳酸アシドーシス下の細胞に投与することを特徴とする細胞死の抑制方法。

【請求項 2】

上記細胞死は、ネクローシス性の細胞死であることを特徴とする請求項 1 に記載の細胞死の抑制方法。

【請求項 3】

上記アニオンチャネル形成ペプチドは、ヘリコバクターピロリ菌由来の VacA タンパク質であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の細胞死の抑制方法。

【請求項 4】

上記アニオンチャネル形成ペプチドは、グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドであることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の細胞死の抑制方法。

【請求項 5】

アニオンチャネル形成ペプチドを含むことを特徴とする細胞死抑制剤。

【請求項 6】

ネクローシス性の細胞死を抑制することを特徴とする請求項 5 に記載の細胞死抑制剤。

【請求項 7】

上記アニオンチャネル形成ペプチドは、ヘリコバクターピロリ菌由来の VacA タンパク質であることを特徴とする請求項 5 または 6 に記載の細胞死抑制剤。

【請求項 8】

上記アニオンチャネル形成ペプチドは、グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドであることを特徴とする請求項 5 または 6 に記載の細胞死抑制剤。

【請求項 9】

請求項 5 ないし 8 の何れか 1 項に記載の細胞死抑制剤を含み、細胞死に起因する疾患の治療に使用される治療薬剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、血液供給の障害によって起こる虚血などの病的現象によって発生する細胞死、特に、乳酸アシドーシス下における細胞膨張を伴うネクロシス性の細胞死を抑制する方法、このような細胞死を抑制する細胞死抑制剤、及びこのような細胞死に起因する疾患の治療薬剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

脳血管障害などの病態において、脳内が虚血に陥ると、しばしば乳酸の蓄積を伴ったアシドーシスに陥ることが知られている。この状態を乳酸アシドーシスと呼ぶ。乳酸アシドーシスに陥ったグリア細胞や神経細胞は、虚血環境の改善がない限り、やがては虚血性細胞死に陥ることが知られている。これまでに、このような細胞死を抑制するために多くの薬剤が開発・研究されてきた。

【0003】

乳酸アシドーシス下では、これらの細胞の容積は持続的に膨張することが知られている。このような細胞の膨張を伴って細胞死に至るものは、ネクロシス性細胞死と呼ばれている。本願発明者等は、乳酸アシドーシス下において細胞容積の持続的な膨張は、（少なくとも神経細胞やグリア細胞においては）容積調節性アニオンチャネルが抑制されているためであることを明らかにしている。これまでに、上記容積調節性アニオンチャネルは、特に低浸透圧刺激時などにおける細胞膨張後に見られる調節性容積減少（RVD）において、必要不可欠なチャネルであることが知られている。このため、乳酸アシドーシス下において、その機能が抑制されている容積調節性アニオンチャネルに代替し得る物質を投与することにより、この持続的な細胞膨張を抑制できる可能性があると考えられている。

【0004】

ところで、細胞死には、上述の細胞の膨張を伴うネクロシス性細胞死以外に

、細胞の収縮を伴うアポトーシス性細胞死がある。このアポトーシス性細胞死を抑制するには、アニオンチャネルブロッカーを使用してアニオンチャネルの働きを抑制するという方法が有効であるということが、本願発明者等の研究グループをはじめとしていくつかのグループによって報告されている。特許文献 1 は、その一例であり、細胞死に起因する疾患の治療にも有用な手段となる可能性があることが報告されている。

【 0 0 0 5 】

【特許文献 1】

特開 2 0 0 2 - 3 4 0 2 (公開日:平成 1 4 年 1 月 9 日)

【 0 0 0 6 】

【非特許文献 1】

Cover TL, Blaser MJ, 「Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*」, J. Biol. Chem., 267, 10570-10575, 1992年

【 0 0 0 7 】

【非特許文献 2】

Wallace DP, Tomich JM, Iwamoto T, Henderson K, Grantham JJ, Sullivan L P, 「A synthetic peptide derived from glycine-gated Cl^- channel induces transepithelial Cl^- and fluid secretion」, Am. J. Physiol., 272, C1672-C1679, 1997年

【 0 0 0 8 】

【非特許文献 3】

Mitchell KE, Iwamoto T, Tomich J, Freeman LC, 「A synthetic peptide based on a glycine-gated chloride channel induces a novel chloride conductance in isolated epithelial cells」, Biochim. Biophys. Acta., 1466, 47-60, 2000年

【 0 0 0 9 】

【非特許文献 4】

第 7 8 回日本生理学会大会予稿集、2 5 4 頁、1 P A 7 6、(発行日: 2 0 0

1年3月1日)

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

上述のように、これまでにアポトーシス性細胞死の抑制方法・抑制剤の研究・開発は盛んに行われてきた一方で、ネクローシス性細胞死の抑制方法・抑制剤についての報告例は確認されていない。即ち、乳酸アシドーシス下において、容積調節性アニオンチャネルに代替し得る物質を投与し、アニオンのみを透過させる人工的アニオンチャネルを形成することをメカニズムとするネクローシス性細胞死の抑制剤が実用化されている例はない。

【0011】

その原因の一つとして、カチオン選択性、または、カチオン・アニオン双方を透過させるイオノフォア（人工的にイオンチャネルやイオントランスポータを形成させる物質）は、グラミシジンやナイスタチンなど、従来からよく知られていたにもかかわらず、アニオン選択性のイオノフォア（アニオンイオノフォア）は、ごくわずかしかな知られていないことが挙げられる。しかし近年、ヘリコバクターピロリ菌（*Helicobacter pylori*）由来のVacAタンパク質（非特許文献1参照）、グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドなどが（非特許文献2及び非特許文献3参照）上記アニオンイオノフォアとしての機能を有するということが明らかにされている。

【0012】

そこで、本発明は、上記アニオンイオノフォアを用いて人工的アニオンチャネルを形成することをメカニズムとする細胞死の抑制方法、細胞死抑制剤、及びその細胞死抑制剤を含む細胞死に起因する疾患の治療薬剤を提供することを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本願発明者等は、虚血後の乳酸アシドーシスにおいてしばしば見られるグリア細胞膨張とそれに続くネクローシス性細胞死とが、容積調節性アニオンチャネルの機能不全によるものであること、及び、ヘリコバクターピロリ菌由来のVac

Aタンパク質が人工的にアニオンチャネルを形成するという性質に着目し、上記 Vac Aタンパク質を乳酸アシドーシス下の細胞に投与することによって、その細胞死が抑制されることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0014】

即ち、本発明に係る細胞死の抑制方法は、アニオンチャネル形成ペプチドを乳酸アシドーシス下の細胞に投与することを特徴とするものである。また、本発明に係る細胞死抑制剤は、アニオンチャネル形成ペプチドを含むことを特徴とするものである。

【0015】

細胞膜上に存在するイオンチャネルは、細胞膜を貫通するタンパク質で、細胞膜を越えて特定のイオンを通す重要な経路であり、細胞内外の物質のやり取りや情報の受け渡しに重要な役割を果たしている。アニオンチャネルは、このイオンチャネルの一種であり、アニオンのみを選択的に透過させるイオンチャネルである。したがって、上記「アニオンチャネル形成ペプチド」とは、上述のようなアニオンチャネルを人工的に形成する外来性のペプチドを意味する。また、上記ペプチドには、オリゴペプチドからポリペプチドに至るまで、種々のアミノ酸残基数からなるものが含まれる。それゆえ、上記ペプチドにはタンパク質も含まれるものとする。

【0016】

一般に細胞は、低張刺激負荷などによってその容積を強制的に膨張させられた場合、その後しばらくすると、元の容積に回復する現象が見られる。この現象は、調節性容積減少（RVD）と呼ばれている。しかし、脳梗塞を発症した場合に起こる脳虚血時にしばしば見られる乳酸アシドーシス条件下では、脳神経細胞及び神経膠細胞（グリア細胞）の容積が膨張したまま元の容積に回復せず、やがて細胞死に陥ることが知られている。即ち、乳酸アシドーシス時には容積感受性アニオンチャネルが阻害されていることによって、RVDが起きないために細胞死が起こる。

【0017】

本発明の細胞死の抑制法及び細胞死抑制剤では、上記アニオンチャネル形成ペ

プチドの作用によって、細胞膜上に人工的にアニオンチャネルを形成させて、RVDを引き起こし、持続的な細胞膨張を抑制させることができる。そして、後述の実施例にも示すように、細胞死を抑制し、細胞の生存率を改善させることができる。このように、上記細胞死の抑制方法及び細胞死抑制剤は、細胞死の中でも特に、乳酸アシドーシス下における細胞膨張を伴うネクロシス性の細胞死を抑制する効果を奏するものである。

【0018】

なお、上記VacAを投与することによって、乳酸アシドーシスによって膨張したグリア細胞にアニオンチャネルを形成すること、及び、上記アニオンチャネルの形成によって、膨張したグリア細胞にRVDが生じることについては、本願発明者等によって上記非特許文献4において既に公表されている。

【0019】

しかしながら、上記非特許文献4にはアニオンチャネルの形成およびそれに伴うRVDによって、ネクロシス性の細胞死が有意に減少し、細胞死の抑制という疾患の予防及び治療的意義については記載されていない。即ち、後述の実施例に記載されている、アニオンチャネル形成ペプチド（VacAタンパク質、グリシンレセプタチャネル変異体ペプチド）の投与によって、細胞死が有意に減少し、細胞の生存率が改善するという事実は、本出願によって初めて明らかにされるものである。

【0020】

上記アニオンチャネル形成ペプチドとして具体的には、ヘリコバクターピロリ菌（*Helicobacter pylori*）由来のVacAタンパク質、グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドを挙げることができる。これらは、実施例にも示すように、乳酸アシドーシス条件下において、実際に細胞の持続的膨張を抑制させることが確認されている。

【0021】

本発明に係る細胞死の抑制方法及び細胞死抑制剤は、虚血後の乳酸アシドーシス下において見られる細胞膨張およびそれに続く細胞死（特に、ネクロシス性細胞死）を抑制することができる。虚血性細胞死は、種々の虚血性疾患に伴って

発生するものであり、これを抑制することによって、脳機能不全や心機能不全さらには死亡を防止することができると考えられる。即ち、上記細胞死の抑制方法及び細胞死抑制剤は、細胞死に起因する種々の疾患の予防及び治療に有効に利用することができる。従って、本発明には、上記細胞死抑制剤を含み、細胞死に起因する疾患の治療に使用される治療薬剤も含まれる。

【0022】

【発明の実施の形態】

以下、本発明についてより詳細に説明する。

【0023】

本発明に係る細胞死の抑制方法は、アニオンチャネル形成ペプチドを乳酸アシドーシス下の細胞に投与することを特徴とするものであり、また、本発明に係る細胞死抑制剤は、アニオンチャネル形成ペプチドを含んでなるものである。

【0024】

ここで、上記アニオンチャネル形成ペプチドとしては、例えば、ヘリコバクターピロリ菌由来のV a c Aタンパク質、グリシンレセプタチャネルの変異体ペプチド、コレラ菌溶血性毒素などを挙げることができる。

【0025】

上記V a c Aタンパク質は、動物の胃内に生息するヘリコバクターピロリ菌（*Helicobacter pylori*）からV a c Aタンパク質が単離されたものであり、人工脂質二重層膜上など、異所的にアニオンチャネルを形成することが知られている（非特許文献1参照）。このV a c Aタンパク質は、上記非特許文献1に記載の方法に基づいて単離することができる。なお、このV a c Aタンパク質には、非特許文献1に記載された一次構造のもののみでなく、アニオンチャネルを形成するという機能が損なわれない程度に、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたタンパク質も含まれる。即ち、上記V a c Aタンパク質の変異タンパク質も上記アニオンチャネル形成ペプチドに含まれるものとする。

【0026】

また、グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドは、上記非特許文献2及び非

特許文献3に記載されているように、グリシンレセプター α サブユニットのポア形成部位に相当する第2膜貫通領域(M2)の23個のアミノ酸からなるポリペプチドにおいて、そのカルボキシ末端に4個のリジンを加えて水溶性を高めたポリペプチドである。このグリシンレセプターチャンネル変異体ペプチドは、上皮細胞モノレイヤーのCl⁻分泌を高めることや、上皮細胞のCl⁻コンダクタンスを高めることが報告されている。上記グリシンレセプターチャンネル変異体ペプチドの作製および取得は、非特許文献2及び非特許文献3に記載の方法に基づいて実施することができる。

【0027】

上記コレラ菌溶血性毒素の性質及び取得方法については、以下の参考文献1、2に記載されている。

参考文献1: Zitzer A, Palmer M, Weller U, Wassenaar T, Biermann C, Tranum-Jensen J, Bhakdi S, 「Mode of primary binding to target membranes and pore formation induced by *Vibrio cholerae* cytolysin (hemolysin)」, Eur. J. Biochem., 247, 209-216, 1997年

参考文献2: Moschioni M, Tombola F, de Bernard M, Coelho A, Zitzer A, Zoratti M, Montecucco C, 「The *Vibrio cholerae* hemolysin anion channel is required for cell vacuolation and death」, Cell. Microbiol., 4 (7), 397-409, 2002年

本発明の細胞死抑制剤は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、サルなど）に対し、細胞死に起因する疾患（特に、ネクロシスの促進に関わる疾患であることが好ましい）の予防または治療薬剤として用いることができる。上記疾患としては、例えば、心筋梗塞、脳虚血などの虚血性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患、うっ血性心不全などが挙げられる。後述の実施例に示されるように、VacAタンパク質などのアニオンチャンネル形成ペプチドを含む上記細胞死抑制剤は、虚血後の乳酸アシドーシス下のグリア細胞膨張を抑制することから、上記疾患の中でも特に、虚血性疾患の予防および治療に使用されることが好ましい。また、本発明の細胞死抑制剤は、上記疾患が1種の場合にも、複数の疾患が併発した場合に

も適用することができる。

【0028】

本発明の細胞死抑制剤は、上記「アニオンチャネル形成ペプチド」のみを含み、それを直接投与して使用することもできるが、通常、上記アニオンチャネル形成ペプチドに加えて、薬理学的に許容される担体がさらに含まれていてもよい。このような細胞死抑制剤の製造は、従来公知の製造方法によって行うことができる。

【0029】

上記薬理学的に許容される担体としては、製剤素材として一般に使用可能な各種有機または無機担体物質を用いることができる。これらは、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤として、あるいは、液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などとして配合される。また、上記細胞死抑制剤における「アニオンチャネル形成ペプチド」としてのVacAタンパク質の含量は $0.2 \sim 5 \mu\text{g/ml}$ であることが好ましく、 $0.5 \sim 2.5 \mu\text{g/ml}$ であることがより好ましい。なお、上記VacAタンパク質は、使用直前に酸性溶液（pH 2）によって活性化させておくことが好ましい。

【0030】

本発明の細胞死抑制剤の剤形としては、例えば、錠剤、カプセル剤（ソフトカプセル、マイクロカプセルを含む）、散剤、顆粒剤、シロップ剤などの経口剤のほか、注射剤、坐剤、ペレット、点滴剤などの非経口剤が挙げられる。これらは毒性も低く、それぞれ経口的あるいは非経口的に投与できる。

【0031】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。但し、本発明はこの実施例の記載に限定されるものではない。本実施例では、本発明に係る細胞抑制剤に含まれるアニオンチャネル形成ペプチドの一例である、VacAタンパク質及びグリシンレセプタチャネル変異体ペプチドが、乳酸アシドーシス下での細胞膨張を抑制できることを確認した。以下には、その確認実験の方法、結果などを示す。

【0032】

(1) 実験方法

[細胞培養法]

ラットのアストログリア細胞系統のC6グリア細胞系列(参考文献:Benda et al., 「Differentiated rat glial strain in tissue culture」、Science 161、370-371、1968)は、アメリカンタイプカルチャーコレクション(American Type Culture Collection)から取得され、ダルベッコの最小必須培地(DMEM)を用いて、37℃、5%のCO₂を含む加湿エア内でペトリ皿で単層培養された。上記培地には、25mMの炭酸水素イオン、10%のウシ胎児血清、100IU/mlのペニシリンG、及び、50mg/mlのストレプトマイシンが添加された。トリプシン処理によって、0.05%トリプシンと0.02%EDTAとを含むリン酸緩衝溶液(PBS)内で融合性の培養液が実験的に取得された。細胞は、800rpmで1分間遠心分離され。上清は除去された。トリプシン活性を抑制するために、細胞はウシ胎児血清を含むDMEM内に懸濁され、2回目の遠心分離が行われた後、上清が除去された。続いて、上記の細胞は、以下の電解質を含み、血清を含まない溶液に懸濁された。

【0033】

電解質: 125mM NaCl、2.5mM KCl、2.0mM CaCl₂、1.0mM MgCl₂、1.25mM NaH₂PO₄、25mM NaHCO₃

この細胞懸濁液は、実験に使用されるまで、95%空気と5%のCO₂とによって泡立てられることによって、37℃、pH7.4で保存された。

【0034】

[細胞容積測定法]

細胞容積は、流動細胞数測定器(フローサイトメータ:EPICS Elite ESP、Coulter Co., Miami, FL)を使用するコールターの原理に基づいて評価された。細胞の生育力についても、ヨウ化プロピジウム遮断テストによって細胞数測定に基づいて評価された。10mlの細胞懸濁液は、10mg/mlのヨウ化プロピジウムを含む2μlのPBSを添加した後、37℃で1分間インキュベートされた

。細胞の平均容積は、 2×10^4 個の細胞を含む $350 \mu\text{l}$ の細胞懸濁液を、上記流動細胞測定器に所定の時間内に注入することによって測定された。基準の細胞容積は、コントロール溶液 (pH 7.4) で20分間インキュベートされる前と後との測定値の平均として得られた。pH 6.2のアシドーシスの効果、及び、pH 6.2の乳酸アシドーシスあるいはpH 7.4の乳酸の効果は、その後、以下に示すように、HCl、乳酸、あるいは、乳酸とトリスをそれぞれ添加することによって観察された。細胞は、コントロール (pH 7.4)、酸性 (pH 6.2) 溶液、あるいは、乳酸を含むpH 6.2の乳酸アシドーシス溶液 (これらは全て等張性である) でプレインキュベートされた後、30%の体積の脱イオン蒸留水で上記等張性の溶液を希釈することによって、低張刺激負荷の効果についても観察された。

【0035】

細胞容積測定のために用いられたコントロール溶液の組成は、125 mM NaCl、2.5 mM KCl、2 mM CaCl_2 、1.0 mM MgCl_2 、10 mM glucose、1.25 mM NaH_2PO_4 、25 mM NaHCO_3 (pH 7.4、in 95%エア/5% CO_2) であった。乳酸アシドーシスの効果を調査するために、培地のpHが、等張性の乳酸溶液を滴下することによって滴定され、乳酸の最終濃度が25 mMに調製された。アシドーシスの効果を調査するために、培地のpHが、HClを用いてpH 6.2に滴定された。乳酸単独の効果を調査するために、25 mM乳酸を含む培地のpHが、7.5 mMの適当量のトリスを加えることによって調製された。凝固点降下浸透圧計 (Vogel GmbH, Giessen, Germany) によって測定された重量モル浸透圧濃度は、コントロール溶液、乳酸含有酸溶液、乳酸含有トリス緩衝溶液、それぞれに対して300、306、312 mOsmol/kg- H_2O であった。

【0036】

[電気生理学法]

全細胞電流記録法 (パッチクランプ法) による観察は、室温 (23~25℃) で実施され、参考文献 (Kubo M., Okada Y., [Volume-regulatory Cl^- channel currents in cultured human epithelial cells]、J. Physiol. 456, 351-371、

1992) に記載の方法に基づいて、ワイドチップ電極 ($\sim 2\text{ M}\Omega$) を使用して記録された。直列抵抗 ($< 5\text{ M}\Omega$) は、電圧誤差を最小化するために、 $60-70\%$ に補正された。電流変化の時間経過が、 0 mV から $\pm 40\text{ mV}$ の保持電位から交流のステップパルス (持続時間 1 s) を 15 秒ごとに加えることによってモニタリングされた。全細胞の容積感受性電流の電圧依存性をモニターするために、ステップパルス (持続時間 2 s) が -60 mV (持続時間 2 s) の前電位から加えられ、膨張誘導電流が定常状態活性化に達した後に、 -60 mV から $+100\text{ mV}$ の電位が 20 mV 毎に試験された。VacA 誘導電流をモニターするために、ステップパルス (持続時間 300 ms) が -80 mV (持続時間 300 ms) の前電位から加えられ、 -80 から $+80\text{ mV}$ の電位が 20 mV 毎に試験された。ステップパルス印加後 2.5 ms の瞬間電流が記録された。容積感受性電流あるいは VacA 誘導電流の電流-電圧曲線 (I-V 曲線) をモニターするために、傾斜指令パルスが -40 mV から $+60\text{ mV}$ の範囲内で 2.5 ms 間加えられた。電流は、EPC-9 増幅器 (HEKA, Lambrecht, Germany) を用いて記録された。電流信号は、 1 kHz で濾波され、 4 kHz でデジタル化された。パルス+パルスフィットソフトウェア (version 8.11; HEKA) が指令パルス制御、データ収集、及び解析に使用された。

【0037】

ほぼすべての細胞のパッチクランプ実験のために、次の溶液 (電解槽) およびピペット溶液が使用された。

【0038】

等張性 ($320\text{ m osmol/kg-H}_2\text{O}$) 電解槽溶液: 110 mM CsCl 、 5 mM MgSO_4 、 90 mM マンニトール、 10 mM HEPES (CsOH で $\text{pH } 7.4$ に滴定されたもの) を含む。

【0039】

細胞膨張は、マンニトールが 40 mM に減らされた低張性 ($270\text{ m osmol/kg-H}_2\text{O}$) の溶液で誘導された。ピペット (細胞間) 溶液 ($290\text{ m osmol/kg-H}_2\text{O}$) は、 110 mM CsCl 、 2 mM MgSO_4 、 $2\text{ mM Na}_2\text{ATP}$ 、 1 mM EGTA 、 60 mM マンニトール、及び 1 mM HEPES (CsOH で $\text{pH } 7.4$ に滴定されたもの) を含む。

2に滴定されたもの)を含む。実験的に、10mM 1,2-ビス(2-アミノフェノキシ)エタン-N, N, N', N'-テトラ酢酸が、1mMEGTAの代わりにピペット溶液に加えられた。容積感受性Cl⁻-チャンネルあるいはVacA誘導チャンネルのアニオン透過性を調査するために、等張性電解槽溶液中で、塩素が等モル濃度のヨウ素、臭素、アスパラギン酸、あるいは、メタンスルホン酸と置き換えられた。VacAチャンネルの透過性についても、次の溶液を使用して調査された。

【0040】

等張性(315mosmol/kg-H₂O)電解槽溶液: 145mMNaCl、5mMKCl、1mMMgCl₂、10mMマンニトール、2mMCaCl₂、10mMHEPES(トリスでpH7.4に滴定されたもの)を含む。

ピペット(細胞間)溶液(300mosmol/kg-H₂O): 30mMNaCl、80mMKCl、2mMMgCl₂、70mMマンニトール、2mMN₂ATP、10mMHEPES(pH7.2)を含む。

【0041】

アスパラギン酸で115mMの細胞外Cl⁻を置換することによって、相対アニオン透過性が調べられた。相対カチオン透過性は、75mMNa⁺及び70mMN-メチル-D-グルカミン(NMDG)で145mM細胞外Na⁺を置換することによって調べられた。

【0042】

(2) 結果及び考察

[乳酸アシドーシス下におけるC6グリア細胞の容積変化]

図1には、pH7.2のコントロール条件下(○)、乳酸アシドーシス下(■)、アシドーシス下(▲)、乳酸投与下(◆)、それぞれの場合のグリア細胞の細胞容積変化を、相対細胞容積で経時的(単位:分)に記録したグラフを示す。

【0043】

コントロール条件下では、C6グリア細胞の平均細胞容積は、 $802.4 \pm 39.4 \mu\text{m}^3$ であり、図1の○で示すように、1時間変化することはなかった。乳酸を添加せずに培地のpHを6.2に下げたもの(即ち、アシドーシス下)は

、細胞容積にわずかな変化が認められた（図中、▲で示す）。対照的に、25 mMの乳酸の投与によって培地のpHが6.2に下げられた場合（即ち、乳酸アシドーシス下）には、細胞容積に顕著な増加が認められた（図中、■で示す）。その平均細胞容積は、投与後2分で基準となる細胞容積のレベルの 1.06 ± 0.02 倍に増加した。そして、緩やかに膨張し続けた後、45分から60分以内に頭打ちの状態に達した（60分後には 1.11 ± 0.02 倍になった）。しかしながら、培地のpHが7.4に維持された場合（図中、◆で示す）には、乳酸単独では顕著な膨張は誘導されなかった。これらの結果から、グリア細胞膨張は、酸化のみ、あるいは、乳酸のみでは何れも誘導されず、乳酸アシドーシスによって誘導されることがわかった。

【0044】

〔乳酸アシドーシス下におけるRVDの阻害〕

図2には、pH7.2のコントロール条件の状態（○）、乳酸のみを投与した場合（◆）、アシドーシス下の場合（△）、乳酸アシドーシス下の場合（■）、それぞれのC6グリア細胞の細胞容積の変化を記録したグラフを示す。

【0045】

低張刺激負荷（70%オスモル濃度）が行われると、C6細胞は一時的に膨張し、引き続いてコントロール状態下に回復することが確認された（図2の○で示す）。RVDが乳酸アシドーシスによって影響されるか否かを調べるために、細胞は乳酸を含む酸性（pH6.2）等張性溶液でプレインキュベートされ、その後、乳酸アシドーシスを維持しながら低張性溶液に浸された。この場合は、図2に■で示すように、乳酸アシドーシス条件下であり、RVDは起こらなかった。しかしながら、pH7.4の乳酸を加えた場合には、RVDはほぼ通常どおり引き起こされた（図2中、◆で示す）。乳酸が欠如した場合には、酸性条件（pH6.2、図中△で示す）下でRVDは一部のみ阻害された。

【0046】

このように、通常の細胞においては、一時的な細胞膨張の後に発生するRVDが、乳酸アシドーシス下では起こらず、細胞が持続的に膨張し続けることが示された。この結果から、乳酸アシドーシス下では、最終的にネクロシス性細胞死

に至ることが示唆される。

【0047】

また、データは示さないが、この細胞容積の持続的な膨張は、容積調節性のCl⁻チャンネルの機能が抑制されていることに起因することが本実験において確認された。

【0048】

[VaccAの投与によるグリア細胞膜上でのアニオンチャンネルの形成]

続いて、VaccAタンパク質を投与した場合に、グリア細胞膜上にアニオンチャンネルが人工的に形成されることを確認した結果を示す。なお、VaccAは、上記非特許文献1に記載の方法によって、ヘリコバクターピロリ菌60190から精製され、酸性(pH2)のリン酸緩衝液によって、37℃で10分間、活性化前処理が施されたものが使用された。

【0049】

上記VaccAを2.5 μ g/mlとなるように加え、37℃で50分間C6グリア細胞をインキュベートした場合、光学顕微鏡で観察すると、細胞の形態変化は誘導されなかった。これは、細胞からのヨウ化プロピジウムの排除によって判断されるように、培地にはアンモニウムのような補足的な弱い塩基が添加されていないので、細胞の生育力に影響を与えないことが原因であると推定できる。しかし、結果として電流は大きく活性化される。上記電流は、時間依存性の活性化や不活性化のキネティクスを発揮することなく(図3(a)参照)、わずかな外向き整流性のみを示す(図3(d)中、○で示す)。乳酸アシドーシス(pH6.2)条件下で記録されるVaccA誘導電流に対する電流(図3(b)参照)とI-V相関(図3(d)中、●で示す)とは、コントロール条件下で記録された電流に対するそれ(図3(d)中、○で示す)と見分けることができない。VaccA誘導電流は、ピペット溶液中の10mMのBAPTAの含有物によって影響を受けない(データ示さず)。NPPB(100 μ M)の細胞外添加は、VaccAによって仲介される電流を強く阻害する(図3(c)参照、図3(d)中○で示す)。

【0050】

このように、VacAをグリアC6細胞に投与すると、乳酸アシドーシス下においてもチャンネルを形成し、そのチャンネルを流れる電流がパッチクランプ法（全細胞法）によって確認された。また、図3（c）、（d）に示されるように、この電流は、Cl⁻チャンネルブロッカとして知られるNPPBによって抑制されることから、アニオンチャンネルによるものであることがわかる。

【0051】

続いて、C6グリア細胞において、全細胞法によって観察されたVacAによる誘導電流がアニオン選択性を示す（即ち、アニオン透過性チャンネルであることを示す）ことを確認した実験の結果を以下に示す。図4（a）は、ランプ波を加えることによって測定された電流-電圧相関を示すグラフであり、細胞外Cl⁻濃度が異なる場合（5 mM、30 mM、110 mMの各場合）のそれぞれの結果を示す。図4（b）は、逆転電位と、細胞外Cl⁻濃度の対数との相関を示すグラフである。図4（c）は、アニオンをI⁻、Br⁻、methansulfonate⁻にそれぞれ置換した場合に、電流-電圧曲線に与える影響を示すグラフである。図4（d）は、カチオン及びアニオンを置換した場合に、電流-電圧曲線に与える影響を示すグラフである。

【0052】

アスパラギン酸との置換による[Cl⁻]₀の減少は、VacAによって仲介される電流の逆転電位の右側へのシフトを誘導する（図4（a）、（b）参照）。このことは、VacAによって仲介される電流がアニオン電流であることを示している。細胞外Cl⁻の他のアニオン種（I⁻、Br⁻、methansulfonate⁻）との置換における逆転電位のシフトも観察される（図4（c）参照）。これらの結果は、以下の表1にまとめられるように、 $P_{I} > P_{Br} > P_{Cl} > P_{methansulfonate} > P_{aspartate}$ というアニオン透過性の順番を示す。

【0053】

【表 1】

VacA によって誘導されるアニオンチャネルの各アニオン許容性 (P_X/P_{Cl})

アニオン (X^-)	V a c A
I $^-$	1.64 ± 0.16
B r $^-$	1.13 ± 0.14
C l $^-$	1
Methansulfonate $^-$	0.45 ± 0.14
Aspartate $^-$	0.27 ± 0.08

【0054】

また、70 mM細胞外 Na^+ の等モル濃度の NMDG との置換において、逆転電位におけるわずかなシフトのみが観察されるように、VacA によって誘導されるチャネルは、ごくわずかなカチオン透過性 ($P_{Na}/P_{Cl} = 0.18 \pm 0.06$) を有することが分かった (図 4 (d) 参照)。

【0055】

以上のように、本実験では、図 3 及び図 4 に示すように、ヘリコバクターピロリ菌の VacA タンパク質の投与によって、C6 グリア細胞の細胞膜のアニオンコンダクタンスが増加されることが見出された。また、この VacA による表 1 に示すようなチャネル透過性は、平面的な脂質二重膜において VacA によって誘導されるチャネルにおけるチャネル透過性と類似している。さらに、本実験では、VacA によるアニオン電流は、乳酸アシドーシスに関係なく誘導され (図 3 参照)、細胞内 Ca^{2+} には依存しないということが確認された。この結果から、VacA によって誘導されるチャネルは、細胞質ゾル Ca^{2+} の依存性の欠如に関して、多くの細胞種において見られる Ca^{2+} 活性化 Cl^- チャネルとも別のものであることが示唆される。

【0056】

これらの事実をまとめると、VacA は C6 グリア細胞の形質膜における外向き整流性・容積感受性アニオンチャネルとは異なり、乳酸アシドーシス下でも機

能的に活性を持つアニオンチャネルを形成することができるということが言える。

【0057】

[乳酸アシドーシスによる細胞膨張のV a c A投与による回復]

次に、C6グリア細胞における乳酸アシドーシスによる細胞膨張に対して、V a c Aあるいはグラミシジン（カチオンイオノフォアを示す）を投与した場合の細胞容積変化を調査した実験結果について、図5のグラフを用いて以下に説明する。図5には、V a c Aあるいはグラミシジンを投与した場合の、時間（分）の経過における相対細胞容積の変化を示す。なお、細胞容積の基本レベルは、正常状態（乳酸アシドーシスが起きていない状態）においてV a c Aを投与した場合のものとし、図5中では◇で示す

乳酸アシドーシスによる細胞膨張は、乳酸アシドーシス下でV a c Aなどの投与なしのもの（図5中■で示す）と比較して、V a c Aが投与されたC6グリア細胞（図5中▼で示す）において顕著に減少する。V a c Aが投与された細胞は、乳酸アシドーシスに反応して一時的にのみ膨張し、約15分後に基本レベルの約 1.05 ± 0.02 倍のピークに達した。しがしながら、その後、アシドーシスが維持されたにもかかわらず、細胞容積は徐々に減少し、45から60分以内に基本レベルにほぼ近いレベル（60分後には約 0.99 ± 0.02 倍）にまで達した。V a c Aを投与した細胞では、乳酸アシドーシスに誘導される一時的な細胞膨張の後の容積制御が、 $100 \mu\text{M}$ のNPPBによって阻害される（図5中、▲参照）。対照的に、C6グリア細胞が $0.5 \mu\text{M}$ のグラミシジンで前処理された場合、乳酸アシドーシスによる持続的な細胞膨張が抑制されなかった（図5中、●参照）。

【0058】

これらの結果から、乳酸アシドーシスによる持続的な細胞膨張は、アニオンチャネルを形成するV a c Aの投与によって抑制され、細胞は元の容積に回復するが、カチオンチャネルを形成するグラミシジンの投与によっては抑制されず、細胞は膨張し続けることが確認された。また、容積感受性Cl⁻チャネルの機能を抑制するチャネルブロッカであるNPPBを投与した場合には、V a c Aの投与

によって形成されたアニオンチャネルの働きが抑制され、細胞容積の減少は起こらないことも確認された。

【0059】

以上のように、本実験では、VacAによって誘導されるアニオン透過性の発現が、持続的な乳酸アシドーシス下でC6グリア細胞に容積制御の能力を与えるということを実証した(図5参照)。この結果は、乳酸アシドーシスによって誘導される外向き整流性・容積感受性アニオンチャネルの損傷は、乳酸アシドーシス下でのRVDの機能障害の原因となるということを示すものである。

【0060】

[グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドの投与によるRVDの誘導]

次に、もう一つのアニオンチャネル形成ペプチドであるグリシンレセプタチャネル変異体ペプチドを、乳酸アシドーシス下のC6グリア細胞に投与した場合の細胞容積変化を調査した結果について、図6を用いて説明する。

【0061】

図6のグラフでは、コントロール状態(pH7.4の正常状態)の細胞容積変化を○で示し、pH7.4(正常状態)においてグリシンレセプタチャネル変異体ペプチドを投与した場合の細胞容積変化を●で示し、乳酸アシドーシス下においてグリシンレセプタチャネル変異体ペプチドを投与した場合の細胞容積変化を▲で示している。図6に示すように、グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドをC6グリア細胞に投与することによって、乳酸アシドーシス下において、細胞の持続的な膨張は抑制され、むしろ細胞容積が減少することが明らかとなった。

【0062】

[細胞膨張下でのRVDの誘導による細胞死の減少]

最後に、乳酸アシドーシス下にある細胞に、アニオンチャネル形成ペプチドの一つであるVacAを投与することによって、実際に細胞死が抑制されるか否かについて確認を行った。その結果を、図7を用いて説明する。

【0063】

図7は、C6グリア細胞における乳酸アシドーシス下で、VacAの投与の有無による細胞のコントロール細胞(pH7.4の正常状態に置かれたもの)に対

する生存率 (%) をフローサイトメトリにより検討した結果を示すグラフである。図 7 においては、乳酸アシドーシス下の細胞 (V a c A 投与なし) の生存率を ▲ で示し、アシドーシス下の細胞の生存率を ▼ で示し、正常状態の細胞に V a c A を投与した場合の細胞の生存率を ◇ で示し、乳酸アシドーシス下の細胞に V a c A を投与した場合の細胞の生存率を △ で示している。図 7 に示すように、乳酸アシドーシス下においては、V a c A を投与しない場合 (▲) に比べて、V a c A を投与した場合 (△) に、細胞の生存率が有意差をもって改善することが示された。

【0064】

このことは、乳酸アシドーシス下にある細胞は、V a c A などのアニオンチャネル形成ペプチドの投与によって R V D が誘導され、持続的な細胞膨張が抑制されることによって、結果として細胞死を抑制し、細胞の生存率を向上させることができるということを示すものである。この結果は、上記アニオンチャネル形成ペプチドを用いた本発明の細胞死の抑制方法、及び、上記アニオンチャネル形成ペプチドが含まれる本発明の細胞死抑制剤の有効性を実証するものであると言える。

【0065】

(3) 結論

乳酸アシドーシス下では、グリア細胞の膨張は、M C T (モノカルボン酸輸送体) を介してプロトン及び乳酸が取り込まれることによって誘発され、容積制御を行うことなく膨張し続けると考えられる。この容積制御の欠損は、容積感受性 C l - チャネル活性の損傷が原因となって起こる。乳酸アシドーシスによって誘導される膨張の後に起こる容積制御は、カチオン透過体であるグラミシジンによって形成されるカチオンチャネルではなく、アニオン透過体である V a c A によって形成される外因性アニオンチャネルの誘導によって可能となる。

【0066】

大脳虚血によって起こる乳酸アシドーシスは、細胞障害性の脳浮腫の主要な要因である。グリア細胞は、細胞障害性の脳浮腫に最も関連の深い細胞である。それゆえ、乳酸アシドーシスによって誘導されるグリア細胞膨張を抑制し、細胞容

積を減少させること（即ち、RVDを発生させること）は、大脳虚血による脳浮腫の予防法および治療法の開発のために非常に有効であると言える。

【0067】

本実験では、容積感受性アニオンチャネル阻害が、グリア細胞における乳酸アシドーシスに誘導される持続的な容積膨張に寄与すること、及び、グリア細胞へのVacA投与によるアニオンコンダクタンスの誘導が、乳酸アシドーシスによって誘導される一時的な細胞膨張の後に容積制御の能力を回復させることを実証した。

【0068】

以上のように、乳酸アシドーシス下に置かれたグリア細胞にアニオンイオノフォアであるVacAタンパク質あるいはグリシンレセプタチャネル変異体ペプチドを投与することによって、その細胞死を抑制できることが明らかになった。この細胞死抑制メカニズムは、持続的細胞膨張から細胞容積を回復することによって達成されたものと考えられる。このメカニズムは、全く新しい発見であり、これまでに開発されてきたあらゆる虚血性疾患の治療薬及び治療方法とも異なるものである。また、乳酸アシドーシス下には、グリア細胞のみならず、神経細胞も同様のメカニズムで持続的細胞膨張が起こっていることが明らかになっており、神経変性疾患の原因となる神経細胞死の抑制にも、本発明の細胞死の抑制方法を適用できる可能性が高いと考えられる。

【0069】

【発明の効果】

以上のように、本発明の細胞死の抑制方法は、アニオンチャネル形成ペプチドを乳酸アシドーシス下の細胞に投与することを特徴とするものである。また、本発明の細胞死抑制剤は、アニオンチャネル形成ペプチドを含むことを特徴とするものである。

【0070】

これらは、虚血後の乳酸アシドーシス下において見られる細胞膨張およびそれに続く細胞死（特に、ネクローシス性細胞死）を抑制することができる。そのため、細胞死に起因する種々の疾患の予防及び治療に有効に利用することができる

。また、本発明の細胞死の抑制方法及び細胞死抑制剤は、従来の虚血性障害を抑制させる薬剤とは全く異なる新しいメカニズムによって細胞死を抑制するものであるため、利用価値が高いと言える。

【0071】

本発明の治療薬剤は、上記の細胞死抑制剤を含み、細胞死に起因する種々の疾患の治療に使用されるものである。この治療薬剤は、脳のみならず心臓などにおいても、種々の疾患に伴う虚血性細胞死及び臓器障害を抑制する薬剤として用いられ、生命の予後の改善や虚血性諸疾患の改善に大きく寄与するものと考えられ、有用性が高いと考えられる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

C6 グリア細胞に対して、乳酸アシドーシス、アシドーシス、及び、乳酸を投与した場合に細胞容積に与える影響を調査した結果を示すグラフである。

【図2】

C6 グリア細胞において、乳酸アシドーシス、アシドーシスを生じさせた場合、及び、乳酸を投与した場合の、RVDに対する影響を調査した結果を示すグラフである。

【図3】

VacAを投与してプレインキュベートされたC6 グリア細胞において、全細胞電流記録法によって記録された電流を示すものである。(a) から (c) は、 $-80 \sim +80 \text{ mV}$ のステップパルスを加えた場合の、電流の反応を記録した結果を示すグラフである。なお、(a) は、pH 7.4 (コントロール条件) で、VacAを投与した場合、(b) は、乳酸アシドーシス下でVacAを投与した場合、(c) は、pH 7.4 でVacA及びNPPBを投与した場合である。(d) は、コントロール (○)、乳酸アシドーシス (●)、NPPBを含む場合 (□)、それぞれにおける瞬間電流の電流-電圧相関を示すグラフである。

【図4】

C6 グリア細胞において、全細胞電流記録法によって観察されたVacA誘導電流のアニオン選択性を示すものである。(a) は、ランプ波を加えることによ

って測定された電流－電圧相関を示すグラフであり、細胞外 Cl^- 濃度が異なる場合のそれぞれの結果を示す。(b) は、逆転電位と、細胞外 Cl^- 濃度の対数との相関を示すグラフである。(c) は、アニオンを置換した場合に、電流－電圧曲線に与える影響を示すグラフである。(d) は、カチオン及びアニオンを置換した場合に、電流－電圧曲線に与える影響を示すグラフである。

【図 5】

C6 グリア細胞における乳酸アシドーシスによる細胞膨張に対して、VacA あるいはグラミシジンを投与した場合の細胞容積変化を調査した結果を示すグラフである。

【図 6】

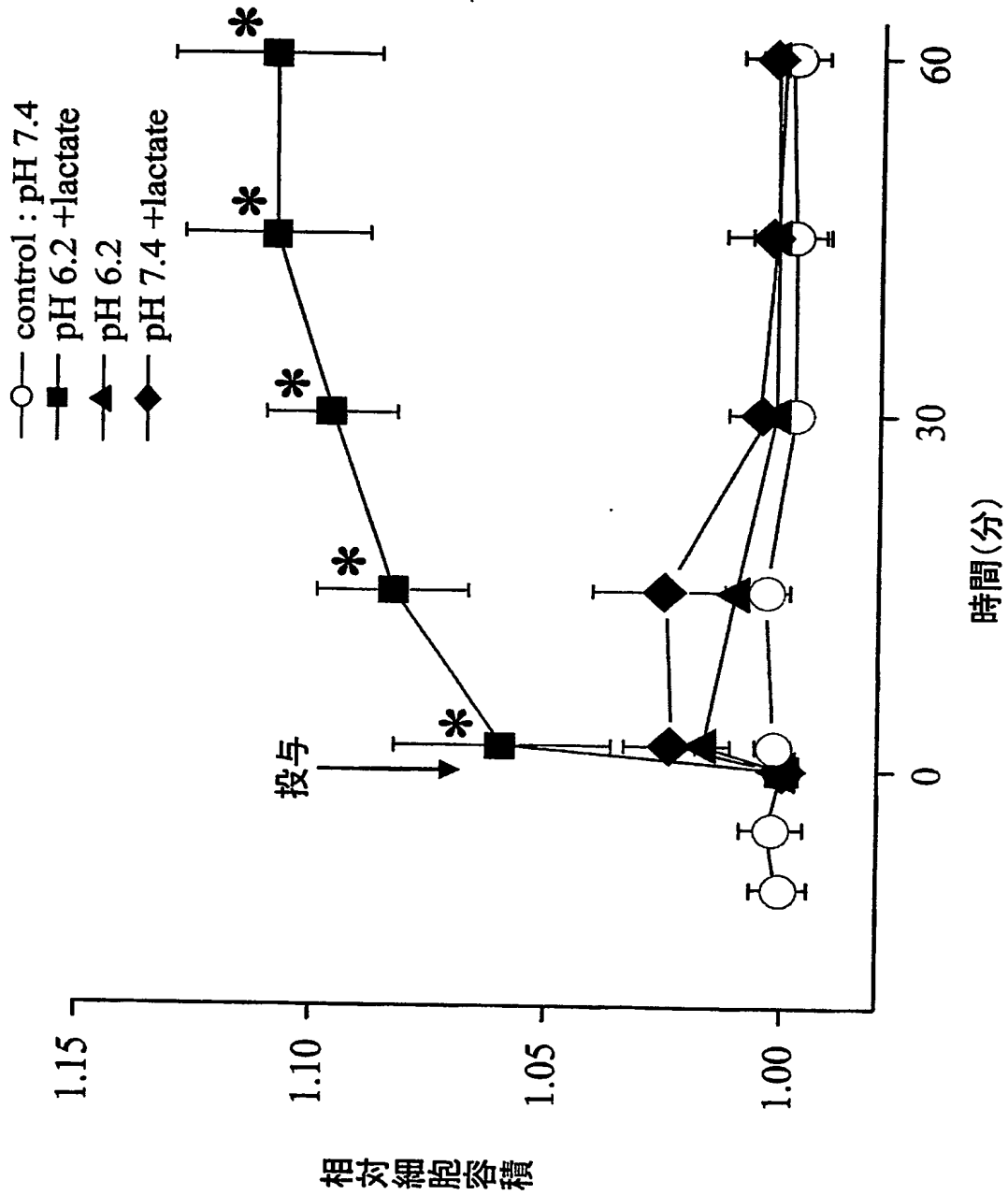
C6 グリア細胞における乳酸アシドーシスによる細胞膨張に対して、グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドを投与した場合の細胞容積変化を調査した結果を示すグラフである。なお、このグラフにおいては、相対細胞容積を%で示す。

【図 7】

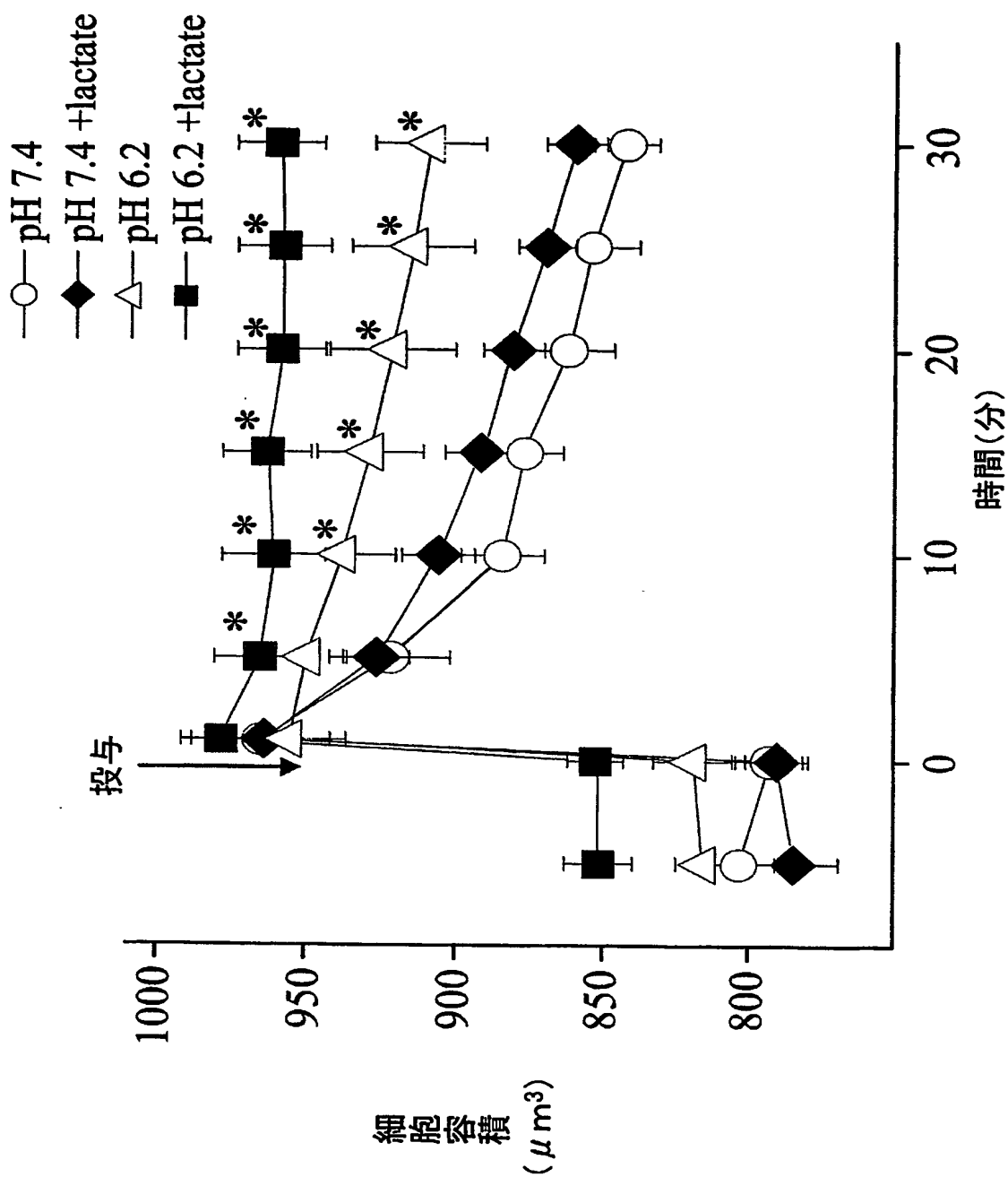
C6 グリア細胞における乳酸アシドーシス下で、VacA の投与の有無による細胞の生存率を調査した結果を示すグラフである。

【書類名】 図面

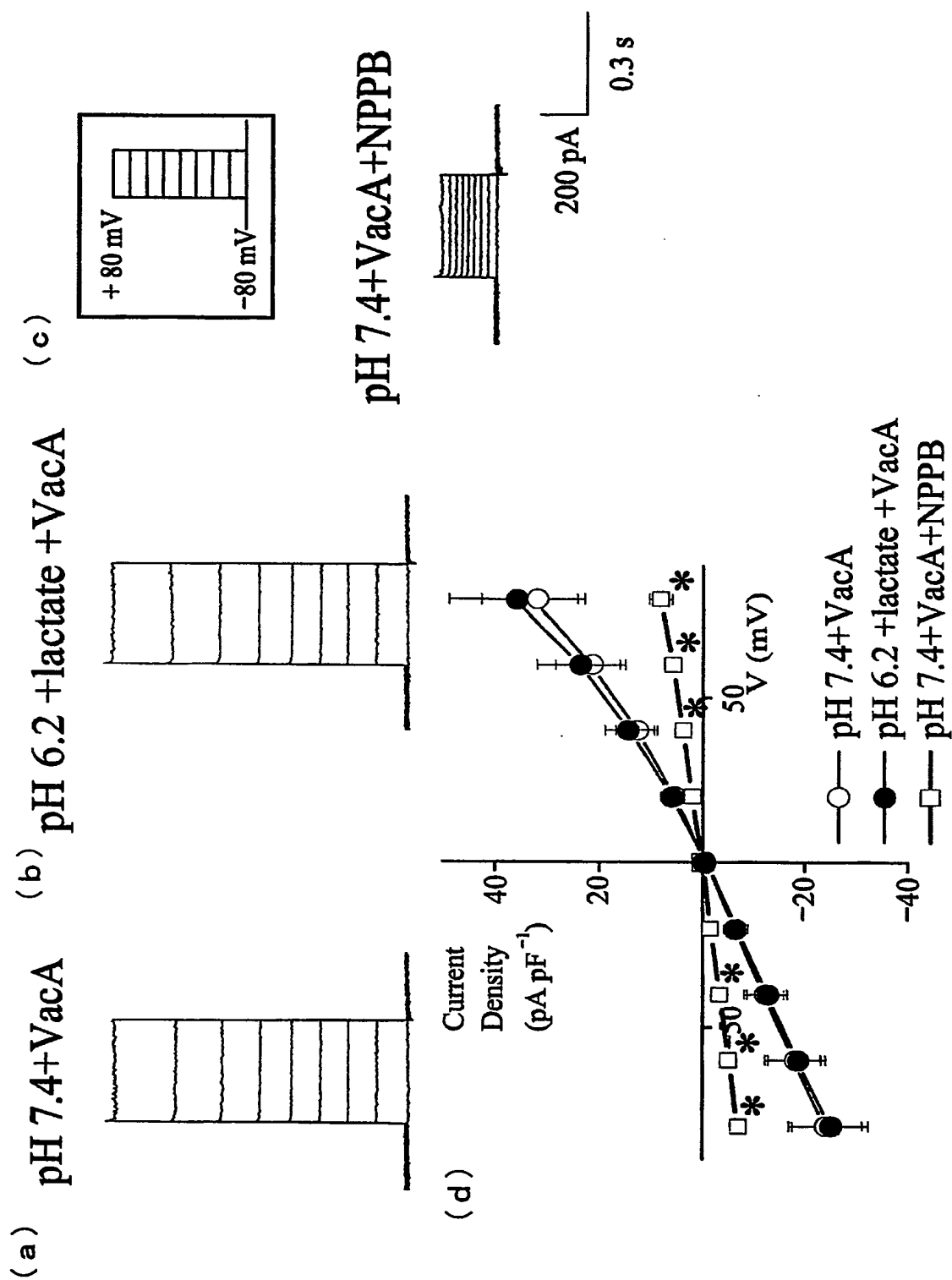
【図 1】



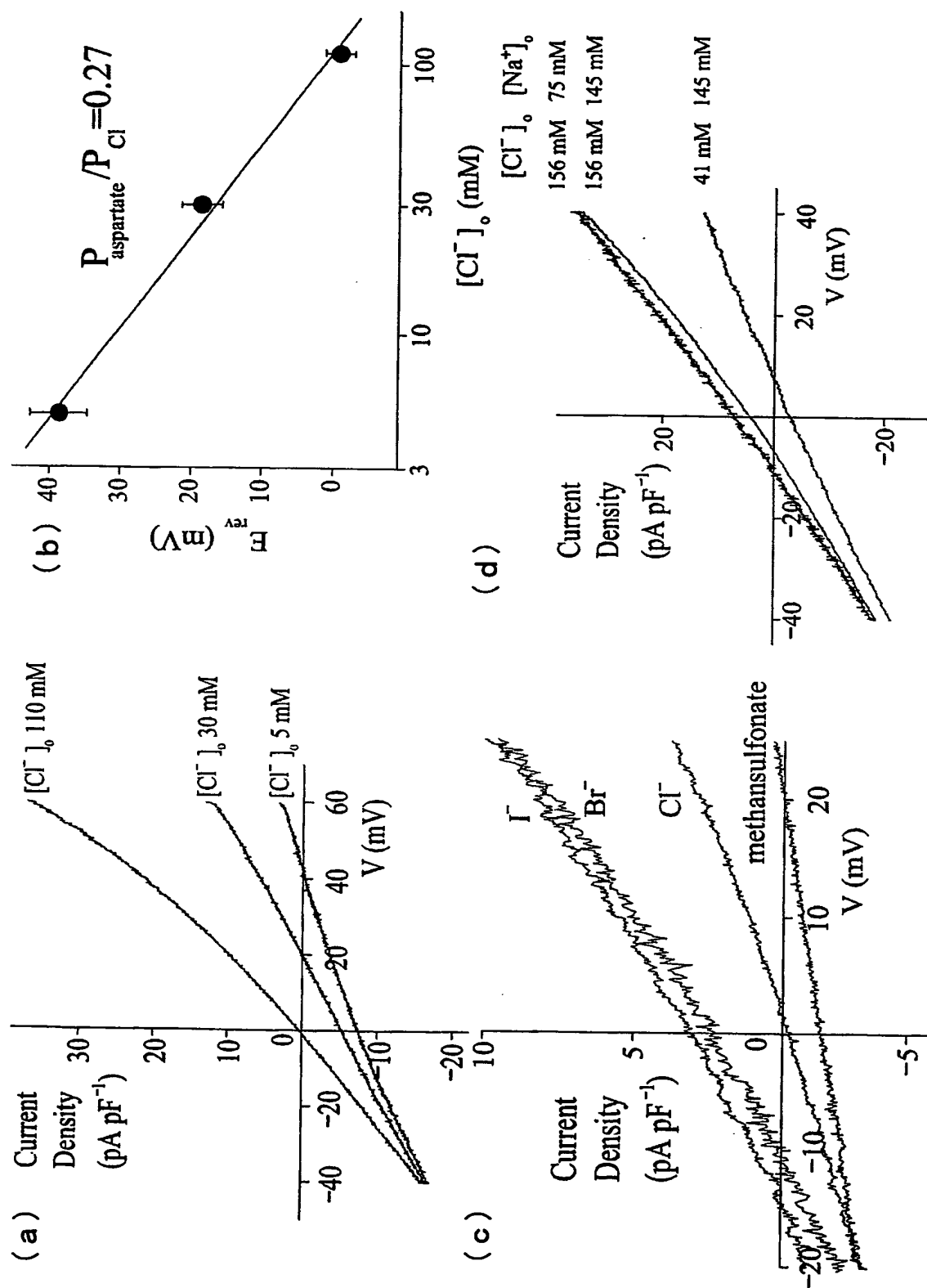
【図 2】



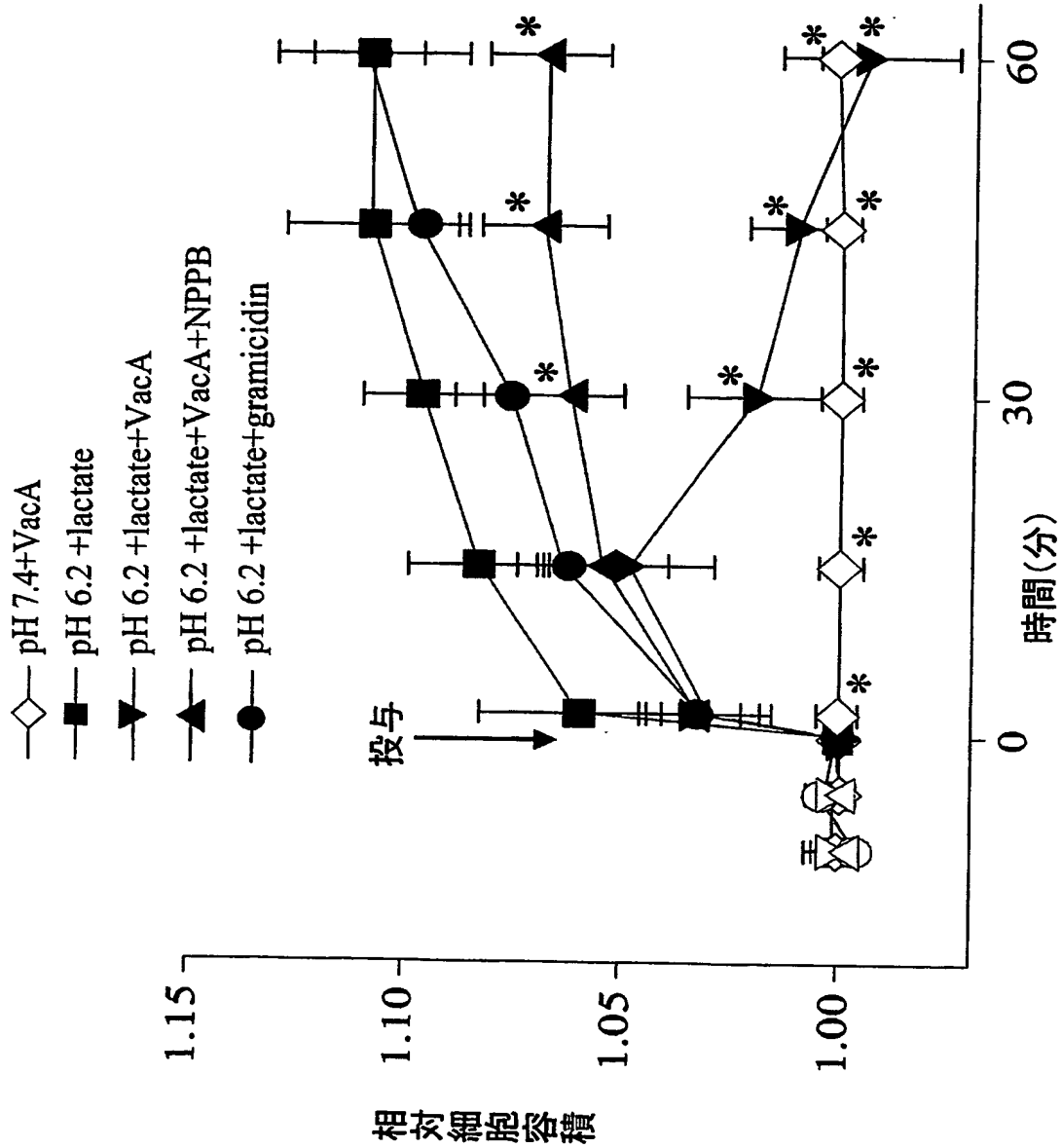
【図 3】



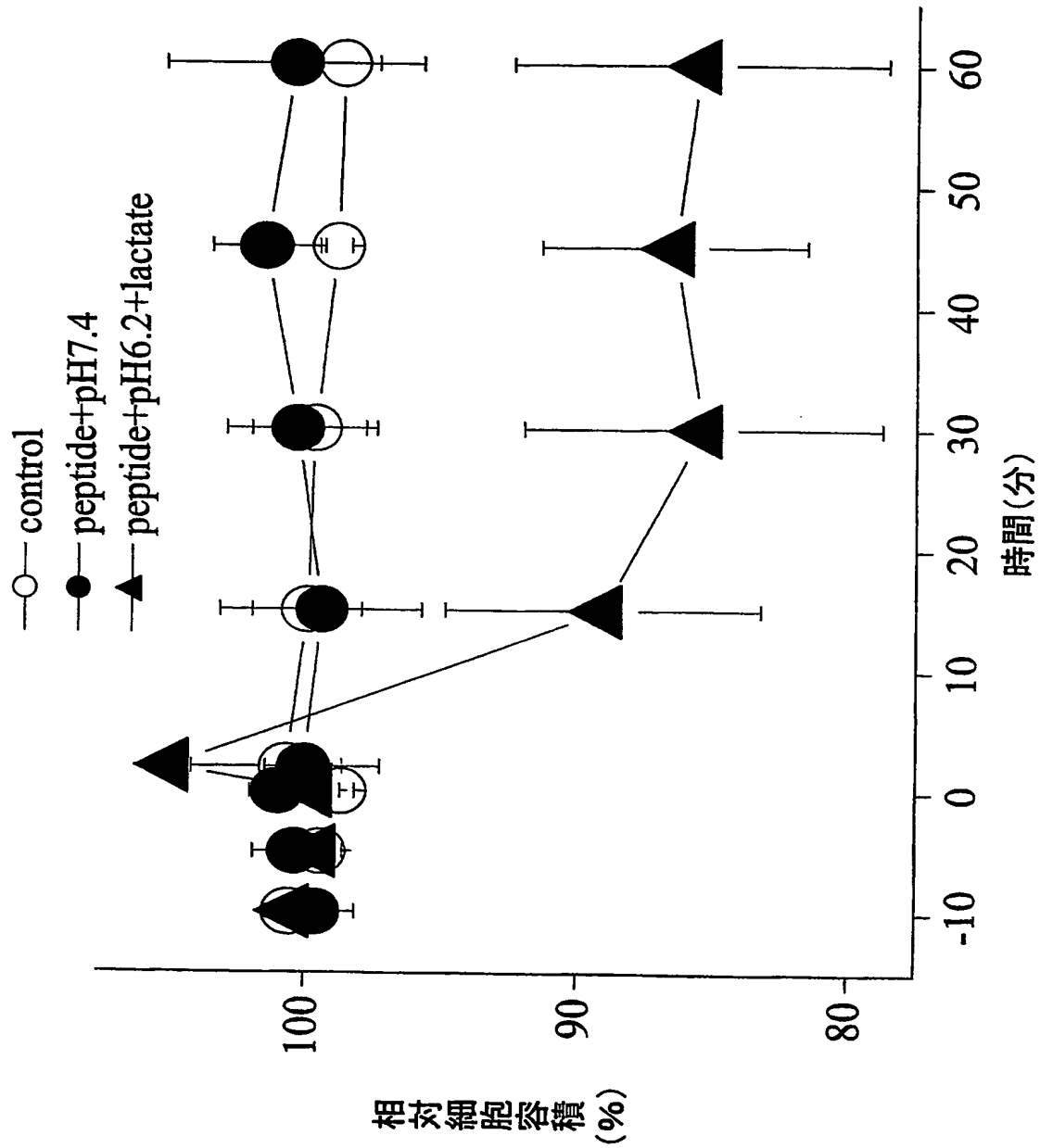
【図 4】



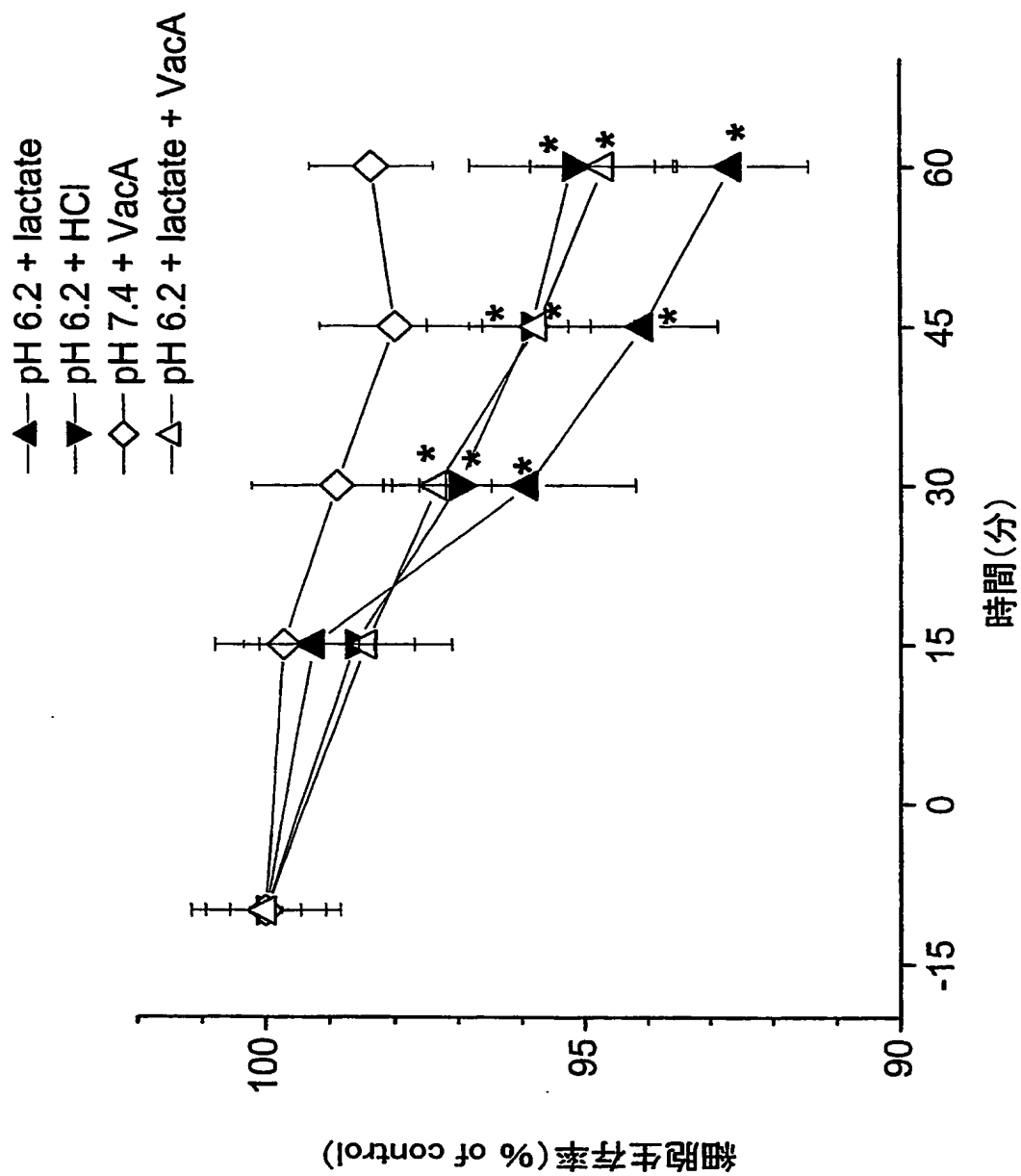
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞死の抑制方法、細胞死抑制剤、及びその細胞死抑制剤を含む細胞死に起因する疾患の治療薬剤を提供する。

【解決手段】 本発明の細胞死の抑制方法は、細胞膜上にアニオンチャネルを人工的に形成するアニオンチャネル形成ペプチドを乳酸アシドーシス下の細胞に投与することを特徴とするものであり、本発明の細胞死抑制剤は、このアニオンチャネル形成ペプチドを含むことを特徴とするものである。このアニオンチャネル形成ペプチドの一例として、ヘリコバクターピロリ菌由来のVacAタンパク質、あるいは、グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドを挙げることができる。本発明の細胞死抑制方法及び細胞死抑制剤は、細胞膨張を伴うネクローシス性細胞死に特に有効に作用するものである。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2002-346325
【承継人】
【識別番号】 503360115
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代表者】 沖村 憲樹
【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417

【提出物件の目録】
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
【物件名】 登記簿謄本 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2002-346325

出願人履歴情報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団

特願 2 0 0 2 - 3 4 6 3 2 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 3 6 0 1 1 5]

1. 変更年月日	2 0 0 3 年 1 0 月 1 日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
氏 名	独立行政法人 科学技術振興機構

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.